



①9 BUNDESREPUBLIK
 DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
 PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
 ⑩ **DE 42 11 238 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
A61 K 31/70
 // A61K 31/70

②1 Aktenzeichen: P 42 11 238.9
 ②2 Anmeldetag: 3. 4. 92
 ④3 Offenlegungstag: 14. 10. 93

DE 42 11 238 A 1

⑦1 Anmelder:
 Budowskij, Edward I., Moskau/Moskva, RU;
 Gavrilov, Aleksander E., Moskau/Moskva, RU

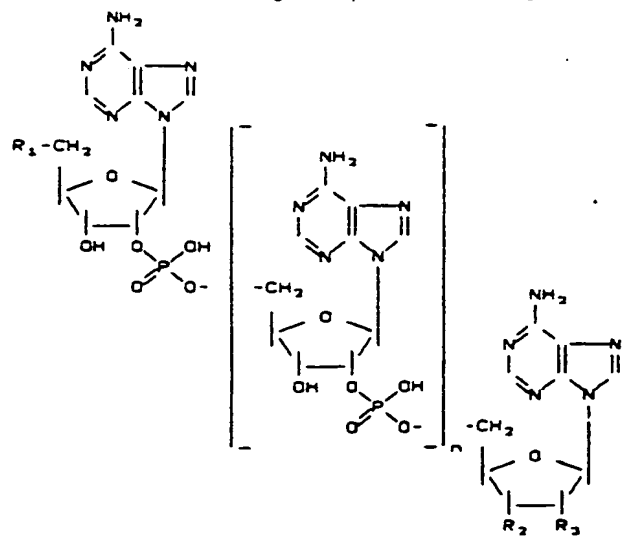
⑦4 Vertreter:
 von Föner, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Ebbinghaus,
 D., Dipl.-Ing.; Finck, K., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,
 Pat.-Anwälte, 81541 München

⑦2 Erfinder:
 Budowskij, Edward I., Moskau/Moskva, RU;
 Želkovskij, Aleksander M., Beverly, Mass., US;
 Pivasyan, Arman D., New Haven, Conn., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verwendung von 2',5'-Oligoadenylaten zur Behandlung von Papillomatosen

⑤7 Verfahren zur Behandlung von durch Papillomaviren verursachten Haut- und Schleimhauterkrankungen durch topische Applikation von 2',5'-Oligoadenylaten der Formel



worin R₁ immer OH bedeutet, bei B R₂ OH und R₃ PO₄⁻² oder R₂ PO₄⁻² und R₃ OH bedeuten, bei C R₂ = R₃ = OH, und n 1 oder 2 bedeutet.

BEST AVAILABLE COPY

DE 42 11 238 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der Medizin, und zwar eine neue Verwendung natürliche Adenosinreste enthaltender Oligoadenylate von unterschiedlicher Länge mit 2',5'-Phosphodiesterinternukleotidbindungen mit freien 5'-endständigen OH-Gruppen und freien oder phosphorylierten 2'- und/oder 3'-endständigen OH-Gruppen zur Behandlung von Haut- und Schleimhautpapillomatosen.

Papillomaviren (Familie Papovaviridae) verursachen Papillomatosen, weit verbreitete Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier (s. W.D.Lancaster, C.Olson /1982/, Microbiol.Rev. 46, 191—207; M.A.Lutzner /1983/, Arch. Dermat., 119, 631—635). Gegenwärtig sind mehr als 60 Typen menschlicher Papillomaviren bekannt (s. H.Pfister /1987/, VI International Papillomavirus Workshop, Georgetown, Washington D.C.; G.Nuovo, C.Crum, E.-M. de Villiers, R. Levine, S. Silverstain /1988/, J.Virol. 62, 1452—1455). Alle diese Viren sind ähnlich gebaut, ihr Genom stellt eine doppelsträngige kovalent gebundene geschlossene ringförmige DNA dar, die Virionenproteine und die für die intrazelluläre Virusentwicklung erforderlichen Proteine kodiert (H.Pfister /1987/, Rev. Physiol.Biochem.Pharmacol. 99, 111—181; D.J. McCance /1986/, Bioch.Biophys.Acta 823, 195—205; H. Pfister /1987/, The papovaviridae /N.P.Salzman and P.M. Howley eds/ v. 2, pp. 1—38. Plenum press, New York). Das Genom der Papillomaviren wird im Kern der infizierten Zellen im Verlaufe vieler Generationen (persistente Infektion) in Form von Episomen redupliziert (Dutzende Kopien pro Zelle). Die Bildung der reifen Virionen erfolgt dann in den Zellen auf der Endstufe der Differenzierung (s. H.Pfister /1987/, The Papovaviridae /N.P.Salzman and P.M.Howley eds/ v. 2, pp. 1—38. plenum Press, New York; L.B.Taichman, S.S. Reilly, R.F.La Porta /1983/, J. Invest.Dermatol. 1, 137s—140s). Die Papillomaviren-DNA in den Zellen in Form freier Episomen verursacht dann gutartige Papillomatosen unterschiedlicher Art. Es besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß diese Episomen in das Wirtszellenchromosom eingebaut werden können. Der Einbau eines bestimmten Teils des Virusgenoms in das Zellchromosom kann zu bösartigen Veränderungen führen (s. H. zur Hausen /1980/, Adv. Cancer Res. 33, 77—107; M. Durst, L.Gissmann, H.Ikenberg, H.zur Hausen /1983/, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80, 3812—3815; T.R.Broker, M. Botchan /1986/, Cancer Cells, 4, 17—36, in: DNA Tumor Viruses, /M.Botchan, T.Grozdzicker, P.Sharpdes, eds/ CSHL; H.zur Hausen, A.Schneider /1987/, The Papovaviridae /N.P.Salzman, P.M.Howley eds/ v. 2, pp. 245—263, Plenum Press, New York; H.zur Hausen /1989/, Cancer Res., 49, 4677—4681; M.Spitzer, B.A.Krumholz, V.L.Seltzer /1989/, Obstetrics. and Gynecol. 73, N3, 303—307). Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Einbaus ist gewöhnlich sehr gering und hängt vom Typ der Papillomaviren und vom Einfluß anderer Faktoren ab. Ca. 30—40% der Bevölkerung leiden jedoch an Papillomatosen.

Das primäre Erscheinungsbild für die Mehrzahl menschlicher Tumore sind daher Papillomatosen. Die gefährlichsten Papillomatosen sind dabei die anogenitalen, die auf sexuellem Wege übertragen werden (s. H.zur Hausen, A.Schneider /1987/, The Papovaviridae /N.P.Salzman, P.M.Howley eds/ v. 2, pp. 245—263, Plenum Press, New York; H.zur Hausen /1989/, Cancer Res., 49, 4677—4681; L.T.Chow, M.Nasserl, S.Wolinsky, T.Broker /1987/, J.Virol. 61, 2581—2588; C.-C.Li, K.V.Shah, A Seth, R.Gilden /1987/, J.of Virol., 61, 2684—2690; Centers for Disease Control /1983/, Morbid.Mortal.Weekly Rep. 32, 306—308). Weit verbreitet sind Papillomatosen auch an anderen Stellen des Körpers, und zwar auf der Haut, in Schleimhautgeweben der oberen Atemwege, des Magens, der Harnblase, des Darms usw.

Da Papillomatosen leicht zu diagnostizierende präkanzeröse Erkrankungen sind, kann die Entwicklung vieler Tumore durch Behandlung gutartiger Papillomatosen verhindert werden, d. h. bevor es zu einer malignen Umwandlung derselben kommt. Gegenwärtig besteht die allgemein übliche Methode bei der Behandlung von Papillomatosen in der chirurgischen Entfernung der Papillome bzw. in ihrer Nekrotisierung durch Einwirkung chemischer Mittel, d. h. Mineral- und/ oder organischer Säuren (s. W.Labhardt, /1984/, Dermatologica, 168, 31—32), Silbersalzen usw., sowie in der Thermo-, Kryo- und Laserkauterisation. Diese Methoden sind schmerzhaft, führen zu Keloiden und gewährleisten keinen Schutz vor Rezidiven. Bis heute gibt es keine wirksamen Mittel zur Behandlung von Papillomatosen. Bis heute wurden Podophyllin (s. K.R. Beutner /1987/, Seminars in Dermatology 6, 10—18) und Interferone (s. J.C.Vance, R.C.Reichman, C.McEwen /1986/, Arch.Dermatol., 122, 277—277; G.Mahrle /1989/, J.Invest. Dermatol., 93, 562; F.G.Bruins, A.J. van der Brule R. Mulnik J.M.Walboomers C.J.Meijer, R.Willems /1989/ J.Invest.Dermatol. 93, 544) auf ihre Wirkung als Arzneimittel für die Behandlung von Papillomatosen getestet. Podophyllin zeigte colchicinähnliche Wirkung auf die Zellteilung (s. L.S.King, M.Sullivan /1947/, Arch.Pathol. 43, 374—386). Selbst die topische Applikation von Podophyllin führt zu bestimmten systemischen Wirkungen wie Schwindelgefühl, Erbrechen, periphere Neuropathie, Tachynoe, Hämaturie usw. (s. K.R.Beutner /1987/, Seminars in Dermatology 6, 10—18).

Bei den für die Behandlung von Papillomatosen in Frage kommenden Dosen (10—30.10⁶ E) pro Behandlungsdauer (s. J.C.Vance, R.C.Reichman, C.McEwen /1986/, Arch. Dermatol., 122, 272—277; G.Mahrle /1989/ J.Invest. Dermatol., 93, 562; F.G.Bruins, A.J. van der Brule, R.Mulnik, J.M.Walboomers, C.J.Meijer, R.Willems /1989/, J.Invest. Dermatol., 93, 544) verursachten Interferone ebenfalls viele Nebenwirkungen einschließlich einer Beeinträchtigung des humoralen und zellulären Immunsystems (s. R. Bauer, I.Böhm, H.W.Niedekken, J.A.Stefan /1989/, J. Investig.Dermatol. 93, 540). Trotz der bekannten antiviralen Aktivität der Interferone ist ihre Wirksamkeit gegenüber durch Papillomaviren verursachten Krankheiten gering (s. J.C.Vance, R.C.Reichman, C.McEwen /1986/, Arch.Dermatol., 122, 272—277; G.Mahrle /1989/, J.Invest. Dermatol., 93, 562; F.G.Bruins, A.J. van der Brule, R.Mulnik, J.M.Walboomers, C.J.Meijer, R.Willems /1989/, J.Invest.Dermatol., 93, 544).

Tierische Zellen enthalten ein intrazelluläres Immunsystem, das durch Interferone aktiviert wird und den antiviralen und antitumoralen Zustand der Zelle gewährleistet (s. P.Lengyel /1982/, Ann.Ev.Biochem., 51, 251—282; M.-F.Dubois, M.Vignal, M.Cunff, C.L.Chang /1983/, Nature, 303, 433—434). Die wichtigsten Stoffe, welche die antivirale Wirkung des Interferons nach der Infektion mit RNA-haltigen Viren vermitteln, sind 2',5'-Oligoadenylate, gebildet aus ATP mit Hilfe von 2',5'-Oligoadenylatsynthetase: pppA — ppp(a2'p5')mA, worin N ≥ 2 (s. P.Torrence /1982/, Mol.Aspects Med. 5, 129—171).

Die Aktivität dieses Enzyms hängt insbesondere von der Anwesenheit doppelsträngiger RNA ab, die gewöhnlich viralen Ursprungs ist. Sämtliche heute bekannten durch 2'-5'-Oligoadenylat vermittelten Mechanismen zur Herstellung eines durch Interferon induzierten antiviralen Zustandes in den Zellen beruhen auf der Aktivierung der L-RNase durch diese am 5'-Ende Pyrophosphat enthaltenden Verbindungen (s. M.I. Johnston, P.F. Torrence /1984/, Interferons, v. 3, pp. 189—298 /Friedman, R.M. ed./, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam). Diese Methoden können daher nur auf Viren angewandt werden, deren Reproduktion die Bildung doppelsträngiger RNA umfaßt. Neben ihrer Aktivität gegenüber RNA-haltigen Viren ist Interferon auch noch wirksam gegenüber bestimmten DNA-Viren und weist außerdem noch antitumorale und antiproliferative Aktivität auf (s. M.-F. Dubois, M. Vignal, M. Cunff, C.L. Chang /1983/, Nature, 303, 433—434; A. Kimchi, H. Shure, M. Revel /1981/, Eur. J. Biochem. 114, 5—11). Diese Aktivitäten lassen sich anhand der Inhibierung der DNA-Topoisomerasen bestimmen (s. F.J. Castora, C.E. Erikson, T. Kovacs, K. Lesiak, P.F. Torrence /1991/, J. Interferon Res. 11, 143—149) (s. jedoch auch A.P. Rice, W.K. Roberts, I.M. Kerr /1984/, J. Virol. 50, 220—228).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden in an sich bekannter Weise durch chemisch-enzymatische Synthese hergestellt. Diese beginnt mit poly(A) mit unregelmäßigen 3',5'- und 2',5'-Internukleotidbindungen. Dieses poly(A) wird erhalten nach dem Michelson-Verfahren (s. A.M. Michelson /1963/, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Acad. Press pp. 418—419) durch chemische Polymerisation von 2'(3')AMP. Die nachfolgende Spaltung der 3'-5'-Bindungen in diesem Polymer durch RNase von B. intermedius in einem Puffer (pH-Bereich 5,0—7,5) führt zu einem Gemisch A, das ein Monomer und 2'-5'-Oligoadenylate von unterschiedlicher Länge, worin R₁ OH und R₂ und R₃ Cyclophosphat bedeuten, enthält. Durch Halten des Gemisches A bei einem pH von 1,0 wird das endständige zyklische Phosphat geöffnet, wodurch man zu einem Gemisch B mit R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = PO₄⁻² oder R₂ = PO₄⁻², R₃ = OH gelangt. Die endständige Phosphatgruppe wird enzymatisch mit bakterieller Alkaliphosphatase entfernt, wodurch man zum Gemisch C (R₁ = R₂ = R₃ = OH) gelangt.

Die Abtrennung der gewünschten Oligomere der Gemische A und B erfolgt durch HPLC-Ionenaustauschchromatographie. Das Gemisch C wird durch Reverse-phase-HPLC abgetrennt.

Die erhaltenen Verbindungen — als Einzelverbindungen oder im Gemisch — sind gegenüber Haut- und Schleimhauterkrankungen hochwirksam, die durch Papillomaviren verursacht werden, deren Vermehrung in Form von Episomen im Zellkern stattfindet. Die unten angeführten Ergebnisse zeigen die Aktivität gegenüber Papillomaviren zumindest im episomalen Zustand, d. h. im Zustand gutartiger durch Papillomaviren induzierter Läsionen vor dem Einbau des Virusgenoms in das Wirtszellenchromosom und damit vor der bösartigen Veränderung.

Das erfindungsgemäße Präparat kann in unterschiedlichen, für die topische Anwendung annehmbaren Formulierungen verabreicht werden. Diese stellt man her durch sorgfältiges Mischen bzw. Lösen der Einzelverbindungen oder ihrer Gemische mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger unter Verwendung der üblichen Techniken, wobei der Träger je nach der für die Applikation erwünschten Formulierung des Präparats, d. h. auf der Außenhaut oder auf Schleimhautgeweben, sehr unterschiedliche Form haben kann. Für die Herstellung der Präparate können die verschiedensten pharmazeutischen Medien verwendet werden, wie z. B. flüssige Träger wie Wasser, Dimethylsulfoxid in An- oder Abwesenheit von Alkoholen, Glycolen usw. oder in Form einer Pomade, einer Salbe oder eines Pflasters. Besonders vorteilhaft ist es, die erwähnten pharmazeutischen Präparate zur Erleichterung und Vereinheitlichung der Dosierung in einer Dosiseinheitsform zu formulieren. Der Ausdruck "Dosiseinheitsform" bezieht sich auf physikalisch diskrete Einheiten, von denen jede eine bestimmte Menge Wirkstoff enthält, die so berechnet ist, daß in Verbindung mit dem erforderlichen pharmazeutischen Träger die gewünschte therapeutische Wirkung erzielt wird. Die entsprechende Dosis für eine Anwendung zur Behandlung von Papillomatosen sollte 10⁻⁹ bis 10⁻⁸ M Wirkstoff (n = 1 und/oder 2) pro Papille (3 bis 5 mm Durchmesser) betragen. Die Gesamtdauer der Behandlung beträgt üblicherweise bis zu 30 Tagen bei täglicher Applikation.

Die folgenden Beispiele dienen der Illustration der Herstellung, schränken den Anspruchsumfang jedoch nicht ein.

A. Herstellung und Reinigung der Einzelverbindungen bzw. ihres Gemisches

(Chemisch-enzymatische Synthese der 2'-5'-Oligoadenylate)

a) Synthese von Poly(A)

0,9 g (2,5 mMol) Adenosin-2'(3')-monophosphat (freie Säure) und 1,2 ml (2,6 mMol) tri-n-Octylamin werden in 30 ml Methanol/Ethanol (1:1) gelöst, wobei die Lösung mehrere Stunden gerührt wird. Danach werden die unlöslichen Anteile mit Hilfe eines Glasfilters abfiltriert, wonach das Filtrat mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingedampft wird. Der erhaltene Feststoff wird dann in 10 ml abs. Dioxan gelöst und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingedampft. Beide Vorgänge werden zweimal wiederholt. Dann wird der erhaltene Feststoff in 5 ml abs. Dioxan gelöst, wonach 0,77 ml (3,75 mMol) Diphenylphosphorylchlorid unter Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers zugetröpfelt werden. Danach werden 3,2 ml (7,5 mMol) tri-n-Octylamin zugesetzt. Dann wird die erhaltene Lösung 1 Stunde lang gerührt, wonach 0,77 ml Diphenylphosphorylchlorid und 3,2 ml tri-n-Octylamin zugesetzt werden und weitere 4 Stunden gerührt wird. Dann wird das Reaktionsgemisch in 5 Vol. Hexan/Ether (4:6) unter Rühren gegossen. Der Niederschlag wird dann abfiltriert und mit dem erwähnten Gemisch und danach mit Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält auf diese Weise ein weißes Pulver von Polyadenylat mit unregelmäßigen 2',5'- und 3',5'-Internukleotidbindungen. Die allgemeine Formel des Gemisches ist (A₂'(3')p₅'(A₂'(3')p)_nA > p, worin 0 %v n < 10.

b) Spaltung der 3',5'-Internukleotidbindungen durch Nukleasespaltung

Das rohe Poly(A) wird in 40 ml H₂O gelöst, wobei der pH mit Tris-base auf 8,0 eingestellt wird. Dann werden 2 ml (1 mg/ml) einer Lösung von RNase aus *Bacillus intermedius* (150 E/mg) zugesetzt, wonach über Nacht bei 37°C gehalten wird. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wird dünnschicht-chromatografisch mit Hilfe von PEI-Cellulose-Blättern überprüft. Das Enzym wird durch Extraktion mit demselben Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die Analyse des erhaltenen Gemisches aus 2',3'-Cyclophosphaten von Adenosin und 2'-5'-Oligoadenylaten erfolgt durch HPLC.

Die allgemeine Formel des Produktes (Gemisch A) ist $A_2'p_5'(A_2'p_5')_nA$, worin $0 \leq n < 10$.

c) Öffnung der 2',3'-Cyclophosphatgruppe der 2'-5'-Oligoadenylate

Der pH-Wert des Gemisches A wird mit 1 M HCl eingestellt.

Danach wird das Gemisch 3 Stunden lang bei 20°C gerührt und dann mit 1 M NaOH neutralisiert. Die Analyse des erhaltenen Gemisches aus Adenosin und 2'(3')-Phosphaten von 2'-5'-Oligoadenylaten erfolgt durch HPLC. Die allgemeine Formel des Produktes (Gemisch B) ist $A_2'p_5'(A_2'p_5')_nAp$, worin $0 \leq n < 10$ (Fig. 1, worin $R_1 = OH$, $R_2 = 2'(3')$ -Monophosphat und $R_3 = OH$ oder $R_3 = 2'(3')$ -Monophosphat und $R_2 = OH$).

d) Entfernung der 2'(3')-Phosphatgruppe durch bakterielle Alkaliphosphatase (BAP)

Das Gemisch B wird 24 Stunden lang mit BAP bei einem pH-Wert von 8,5 (2 E BAP je 1000 OD-E₂₆₀) bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Hydrolyse wird das Enzym durch Extraktion mit demselben Volumen eines Gemisches von Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die Analyse des erhaltenen Gemisches aus Adenosin und 2'-5'-Oligoadenylaten erfolgt durch HPLC. Die allgemeine Formel des Produktes (Gemisch C) ist $A_2'p_5'(A_2'p_5')_nA$, worin $0 < n < 10$ ist (Fig. 1, worin $R_1 = R_2 = R_3 = OH$).

Analyse und Reinigung der 2'-5'-Oligoadenylate

Die Ionenaustauschchromatographie der Gemische A und B erfolgt an einer Diasorb-NH₂-Säule (5 µm, 4,6 × 125 mm für die Analyse und 10 µm, 9,2 × 250 mm für die präparative Reinigung; Eluierungsmittel NH₄OAc, pH 6,5; in 20% CH₃OH, linearer Gradient von 0 bis 1M NH₄OAc, Fließgeschwindigkeit 0,75 ml/min für die analytische und 4 ml/min für die präparative Säulen). Der Nachweis erfolgt mit Hilfe eines UV-Prüfgeräts bei 260 nm.

Die Reverse-phase-Chromatographie von Gemisch C erfolgt an einer Zorbax ODS-Säule (10 µm, 4,6 × 250 mm für die Analyse und 10 µm, 9,2 × 250 mm für die präparative Reinigung; Eluierungsmittel — 7,5% MeOH in 0,1 M NH₄OAc, pH 7,0; Eluierungsprofil — isokratisch; Fließgeschwindigkeit — 1 ml/min für die analytische und 4 ml/min für die präparative Säule. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe eines UV-Prüfgeräts bei 254 nm.

Alle Gemische enthalten aufgrund der optischen Dichte bei 260 nm 50 bis 70% Monomer, 20 bis 50% Diadenylat, 8 bis 15% Triadenylat, 2 bis 7% Tetraadenylat und ca. 2% höhere Oligoadenylate. Der durchschnittliche molare Extinktionskoeffizient betrug $15,48 \cdot 10^3$ für das Monomer, $28,81 \cdot 10^3$ für das Dimer, $36,8 \cdot 10^3$ für das Trimer und $45,8 \cdot 10^3$ für das Tetramer.

Die einzelnen Komponenten ergaben nach Öffnung des Cyclophosphats (im Falle der Verbindungen der Serie A), Dephosphorylierung und alkalische Spaltung der Internukleotidbindungen ein Verhältnis Adenosin : Adenylsäure von 1:2 für das Trimer und 1:3 für das Tetramer. Dieselben Verhältnisse von endständigem Phosphat (Cyclophosphat- bzw. Monophosphatgruppen in den Verbindungen der Serien A bzw. B) zu Internukleotidphosphat erhielt man für diese Verbindungen aufgrund ihrer ³¹P-NMR-Spektren.)

Die Oligoadenylate sind farblose Verbindungen und in Wasser (bis zu 10⁻² M), Dimethylsulfoxid, wässrigem Ethanol oder Glycerin leicht löslich. Sie sind in neutraler wässriger Lösung bei 4°C mehrere Monate lang und in eingefrorener Lösung (unter -20°C) oder in lyophilisiertem Zustand unbegrenzt löslich.

B. Pharmakologische Beispiele

Die starke antipapillomvirale Aktivität der beschriebenen Verbindungen und ihrer Gemische geht aus den Ergebnissen der nachfolgend beschriebenen Versuche deutlich hervor. Diese Daten dienen lediglich der Illustration der nützlichen antipapillomatotischen Eigenschaften der Verbindungen und ihrer Gemische und stellen keine Einschränkung der Erfindung bezüglich des Umfangs der empfänglichen Viren und auch nicht bezüglich des Umfangs der erwähnten Verbindungen dar.

Die pharmakologische Prüfung der Einzelverbindungen bzw. ihrer Gemische erfolgte durch topische Applikation der Einzelverbindungen bzw. das Oligomerengemisch enthaltenden wässrigen Lösung. Die Papillome wurden täglich während 2 Wochen oder weniger (wenn das Papillom sich früher zurückbildete) durch Befeuchtung des Papilloms (Durchmesser bis zu 5 mm) mit 10–50 µl der Lösung behandelt. Dauerhafte positive Ergebnisse erzielte man bei Konzentrationen an aktiver (aktiven) Verbindung(en) (Trimer und/oder Tetramer) von $\geq 10^{-5}$ M. Die Konzentration der aktiven Verbindung(en) wurde ausgehend von der optischen Dichte der Lösung errechnet unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten bei 260 nm für die Einzelverbindungen und ihren Gehalt im Gemisch. Konzentrationen, die nachfolgend für die klinische Prüfung der Gemische aus B und C angegeben sind, geben den Gesamtgehalt an sämtlichen Oligomeren wieder.

Die Konzentration der aktiven Oligoadenylate in den Behandlungslösungen ist zwar wenigstens um zwei

Größenordnungen höher als im Falle der interferoninduzierten Zellen, die Gesamtmenge an aufgebrachter Lösung liegt jedoch gewöhnlich unter 1,0 ml. Selbst wenn alle Oligoadenylate absorbiert werden, liegt ihre Durchschnittskonzentration in den Zellen und Körperflüssigkeiten (Blut, Urin usw.) weit unter der in den nicht induzierten Zellen. Die Konzentration an den aufgebrachten Verbindungen kann daher nur vorübergehend (unmittelbar nach Behandlung) höher sein als die ihrer natürlichen Analoga in den normalen Zellen und das auch nur in den Geweben in der unmittelbaren Umgebung der Applikationsstelle.

Die 2'—5'-Oligoadenylate können durch Nucleasen und Phosphatasen, die innerhalb und außerhalb der Zellen des Organismus vorhanden sind, leicht abgebaut werden. Als Endprodukte fallen dabei Adenylsäure und Adenosin an, die übliche Zellmetabolite darstellen, deren Durchschnittskonzentration in den Zellen unter 10^{-3} M liegt.

Die Behandlung der Kondylome führte dazu, daß sich in der ersten Woche ihre Größe verringerte und sie innerhalb einiger Wochen völlig verschwanden. Bei gewöhnlichen und flachen Warzen sowie bei Sohlenwarzen erfolgte die völlige Genesung im allgemeinen innerhalb einiger Wochen, in einigen Fällen jedoch verschwanden die Warzen innerhalb 4 bis 8 Wochen nach Behandlungsende.

In keinem einzigen Fall wurden toxikoallergische oder andere Nebenwirkungen beobachtet. Die Behandlung ist schmerzlos und führt zu keinerlei Narbenbildung oder anderen sichtbaren Veränderungen in der Haut und in den Schleimhautgeweben. Wie der übliche Ames-Test ergeben hat, zeigen die Gemische A, B und C bei Ausgangskonzentrationen im Züchtungsmedium von bis zu 10^{-3} M keine nachweisbare mutagene Aktivität. Gewöhnlich führte bei mehr als 80% der Patienten die Behandlung zu einer vollständigen Genesung ohne Rückfälle wenigstens während 3 bis 4 Monaten.

Beispiel 1: Klinische Prüfung des Gemisches B

(Gemisch B enthält 2'(3')-Phosphate von Adenosin und 2'—5'-Oligoadenylate der allgemeinen Formel $A2'p5'(A2'p5')_nAp$, worin $n = 0, 1, 2$, und höhere Oligomere im Verhältnis 47:26:15:6:6 aufgrund der HPLC-Analyse. Die Konzentration ist dabei bezogen auf die Summe von Trimer und Tetramer, d. h. $n = 1$ und 2).

Behandelt wurden 26 Patienten mit den nachfolgend genannten Papillomformen (ein Teil der Ergebnisse ist in Tabelle 1 zusammengefaßt): disseminierte Kondylome an den äußeren Genitalien (8 Patienten); gewöhnliche Warzen auf der Brust und am Hals (5 Patienten), flache Warzen (13 Patienten). Die Behandlung erfolgte durch Befeuchtung der Papillome mit 1—2 Tropfen (10—20 μ l pro Papillom einer wäßrigen Lösung des Gemisches B (10^{-4} M) ein- oder zweimal täglich. Die Standardblut- und -urinalyse vor, während und nach der Behandlung mit Gemisch B ergab keine pathologischen Veränderungen.

Tabelle 1

Behandlung humaner äußerer Papillomatosen mit Oligoadenylatgemischen

Art der Läsion	Zahl der Patienten* (gesamt/ Genesungen)	Gemisch- art	Behand- lungs- dauer** (Wochen)	Dauer der Genesung (Wochen)					
				1	2	3	4	5	≥6
	2/2	B	2		2				
	2/2	B	4					2	
	1/1	B	10						1
Condylomata	2/2	B	1		2				
acuminata	4/4	C	1		4				
Flache Warzen	11/10	C	2		10				
Nicht identifizierte Papillomatosen	1/1	B	2		1				
	1/1	B	4						1

*) In den meisten Fällen wiesen die Patienten Mehrfachläsionen desselben Typs auf.

**) Jede Läsion wurde mit 10 - 20 µl einer 10⁻⁴-10⁻⁵ M-Lösung des jeweiligen Gemisches ein- bis zweimal täglich befeuchtet.

Bei den männlichen Patienten waren die Kondylome über den Penisspalt und das Präputium verteilt, zeigten Nippelform, wiesen in bestimmten Fällen blumenkohlähnliches Aussehen auf und waren mit einem übelriechenden Schleim bedeckt. Am Ende der ersten Behandlungswoche kam das Wachstum der bereits gebildeten Papillome zum Stillstand und neue wurden nicht gebildet. Nach zwei Wochen waren die jüngeren Papillome vollständig zurückgebildet. Innerhalb von vier Wochen zeigten drei Patienten eine vollständige Rückbildung der Papillome ohne Narbenbildung oder andere Spuren auf der Haut. In einem Fall war eine erhebliche Besserung des Zustandes festzustellen, während in zwei Fällen sich die Kondylome nicht zurückbildeten.

Die gewöhnlichen Warzen waren in der Hauptsache kleine Papillome mit dünnem Hals und schwach ausgeprägter Pigmentierung. Während 1,5—2,0 Wochen der Behandlung zeigte ein Patient vollständige Rückbildung der Papillome und bei den übrigen drei Patienten waren am Ende der Behandlungsdauer nur noch die größeren Papillome zurückgeblieben. Die beiden flache Warzen aufweisenden Patienten, die ein Monat lang behandelt wurden, waren danach vollständig wiederhergestellt.

In allen Fällen bewirkte die Behandlung keine toxiko-allergischen Reaktionen.

Klinische Fälle

1. Patient B., Alter 30

Diagnose: scharfkantige Kondylome.

Befund: papillomatöse Ausstreuungen an der Penisspalte, welche die Größe eines Streichholzkopfes erreichten, mit einer hahnenkammähnlichen Porenstruktur. Die Oberfläche der Papillome war mit einer weißlichen, übelriechenden Schicht bedeckt.

Behandlung: Befeuchtung der Papillome einmal pro Tag mit einer wäßrigen 10^{-4} M Lösung des Gemisches B. Am vierten Tag begannen die Papillome zu schrumpfen und am siebten Tag war die Penismucosa bereits völlig frei von pathologischen Erscheinungen und blaßrosa gefärbt. An der Stelle der Kondylome waren keine narbenähnlichen Veränderungen festzustellen.

2. Patient M., Alter 42

Diagnose: gewöhnliche Warzen.

Befund: zwei runde, sich über die Hautoberfläche leicht erhebende Papillome (Durchmesser 0.6–0.8 cm) auf der Oberfläche des linken Handgelenks. Die Papillome zeigten eine ins Graue gehende gelbe Färbung und hatten eine etwas unebene Oberfläche. Die Papillome standen mit den darunter liegenden Geweben nicht in Verbindung.

Behandlung: Befeuchtung der Papillome einmal pro Tag mit einer wäßrigen 10^{-4} M Lösung von Gemisch B. Nach der ersten Behandlungswoche kam es zur Abflachung der Papillome und am 15. Tag wurde eine vollständige klinische Genesung festgestellt. Die Haut hatte an den befallenen Stellen ihre natürliche Farbe wiedergewonnen; narbenähnliche Veränderungen wurden nicht festgestellt.

3. Patientin M., Alter 33

Diagnose: scharfkantige Kondylome im Bereich der kleinen Schamlippen und im Afterbereich.

Anamnese: akute Gonorrhoe, Schädigungen im Colon- und Rektalbereich. Wassermann-Reaktion negativ.

Befund: zahlreiche blumenkohlähnliche rosa-gelbe dünnhalsige Papillome auf der Schleimhaut der kleinen Schamlippen. Die Papillome waren mit einer weißlich-trüben Schicht überzogen. Zahlreiche Papillome desselben Typs waren auch auf der Haut im äußeren Analbereich festzustellen. Behandlung: Täglich wurde das Gemisch B (10^{-4} M) appliziert. Am dritten Tag begannen die Papillome zu schrumpfen, die kleineren verschwanden und am achten Tag waren die Kondylome vollständig zurückgebildet. An der Stelle der früheren Papillome waren keinerlei narbenähnliche Veränderungen festzustellen. Schleimhaut und Haut zeigten die übliche Färbung. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

4. Patient U., Alter 38

Diagnose: gewöhnliche Warzen.

Befund: zahlreiche Papillome auf der Innenseite der Handgelenke von der Größe eines Getreidekorns, leicht über die umgebende Haut erhaben, schwach rosafarben. Behandlung: Täglich wurde das Gemisch B (10^{-4} M) appliziert. Am fünften Behandlungstag wurde eine Abflachung der Papillome festgestellt, am siebten bis achten Tag waren lediglich die größeren Papillome zurückgeblieben. Die klinische Genesung wurde am 14. Tag festgestellt. Die Hautlinien waren wiederhergestellt. Keine Nebenwirkung.

5. Patient I., Alter 28

Diagnose: Papillom auf dem linken oberen Augenlid. Befund: ein einziges Papillom von Hirsekorngröße, hautfarben, ohne Entzündung auf der Haut des linken oberen Lids oberhalb der Wimpern.

Da die übrige Lidhaut intakt war, wurde auf einen chirurgischen Eingriff verzichtet.

Behandlung: Verwendung von Gemisch B (10^{-4} M). Am sechsten Behandlungstag wurde eine Schrumpfung des Papilloms festgestellt. Am 12. Tag war es vollkommen zurückgebildet, wobei keine narbenähnlichen Veränderungen festzustellen waren.

Beispiel 2: Klinische Prüfung des Gemisches C.

(Das Gemisch enthält Adenosin und 2'–5'-Oligoadenylate der allgemeinen Formel $A_2'p_5'(A_2'p_5')_nA$; bezüglich des Komponentenverhältnisses und der Konzentrationsangaben siehe Beispiel 1).

An 15 Patienten wurde das Gemisch C (wäßrige 10^{-4} M Lösung) getestet. (Ein Teil der Ergebnisse ist in Tabelle I angegeben). Vier Patienten litten an scharfkantigen Kondylomen im Bereich des Penisgelenks und der Eichel. Sieben Patienten zeigten flache Warzen auf dem Körper sowie an Armen und Beinen. Medikation: Die Kondylome wurden einmal täglich mit der Lösung von Gemisch C behandelt. Die Warzen waren vorgängig mit keratolytischen Präparaten (im Falle ausgeprägter Hyperkeratose) vorbehandelt worden, wonach täglich Gemisch C aufgebracht wurde.

Die Kondylome begannen am zweiten bis vierten Tag zu schrumpfen und am sechsten bis achten Tag war die Schleimhaut vollständig durchsichtig.

Die Verwendung von Gemisch C zur Behandlung flacher Warzen erwies sich als überaus effektiv. Bei

täglicher Applikation flachten sich die meisten Papillome nach fünf bis sieben Tagen ab und waren nach 12 bis 15 Tagen vollständig zurückgebildet.

Beispiel 3: Klinische Prüfung des Trimers und Tetramers B

5 (A2'p5'(A2'p5')_nAp, n = 1 bzw. 2)

Patient B., Alter 22.

10 Diagnose: gewöhnliche Warzen.

Befund: mehrfache (elf) Papillome, leicht erhaben, größere Papillome mit unebener Oberfläche, an der Außenseite des linken Handgelenks.

15 Behandlung: Jedes Papillom wurde zwei Wochen lang oder kürzer jeden Tag mit einer wäßrigen Lösung (10^{-5} M) von Trimer B behandelt. Die kleineren Papillome (acht von elf) verschwanden am achten bis neunten Tag vollständig, die größeren zwei bis drei Wochen nach Abschluß der Behandlung. Innerhalb der darauffolgenden sechs Monate wurde kein Rückfall beobachtet.

Patient Ju., Alter 41

20 Diagnose: gewöhnliche Warzen.

Befund: Sechs Warzen (Durchmesser 2–4 mm, Höhe 1–3 mm) auf dem linken Handgelenk, dunkelbraun, hart, mit rauher Oberfläche.

25 Behandlung: Die Warzen wurden zwei Wochen lang jeden Tag mit je 50 µl einer Lösung (10^{-5} M) von Tetramer B behandelt. Vor jeder Anwendung wurden die Warzen mit einem keratolytischen, Chymotrypsin enthaltenden Präparat behandelt, um die Oberfläche aufzuweichen. Am sechsten bis neunten Behandlungstag waren alle Warzen abgeflacht, drei von ihnen verschwanden gleichzeitig am elften Tag, zwei in der zweiten bzw. vierten Woche nach der Behandlung, die letzte war zumindest 12 Wochen nach der Behandlung noch vorhanden.

Beispiel 4: Klinische Prüfung von Trimer und Tetramer C

30 (A2'p5'(A2'p5')_nAp, n = 1 bzw. 2)

Patientin P., Alter 12 Jahre

35 Diagnose: scharfkantige Kondylome

Befund: unterhalb des Kinns acht dünnhalsige Kondylome (2–3 mm, Gesamtfläche etwa 2 cm²), sowie ein flaches Kondylom. (Durchmesser ca. 3 mm). Alle Kondylome sichtlich dunkler als die umgebende Haut. Behandlung: Die Kondylome wurden täglich mit einer wäßrigen Lösung ($5 \cdot 10^{-5}$ M) von Trimer C befeuchtet. Am sechsten bis siebten Tag begannen alle Kondylome zu schrumpfen und verschwanden am 12. bis 14. Tag vollständig, ohne sichtbare Spuren zu hinterlassen. Die flache Warze war selbst acht Wochen nach der zweiwöchigen Behandlung noch vorhanden.

40

Patient O., Alter 27

45 Diagnose: gewöhnliche Warzen.

Befund: drei gelb-braune weiche Warzen (Durchmesser 2–3 mm, Höhe 1–1,5 mm) auf der linken Wange.

50 Behandlung: Die Warzen wurden täglich mit je 50 µl einer Tetramer C-Lösung (10^{-4} M) behandelt. Am vierten bis achten Tag begannen die Warzen zu schrumpfen und verschwanden am 10. bis 12. Behandlungstag vollständig. Spuren auf der Haut, negative Reaktionen oder Rückfälle während der Behandlung und zehn Wochen danach wurden nicht beobachtet.

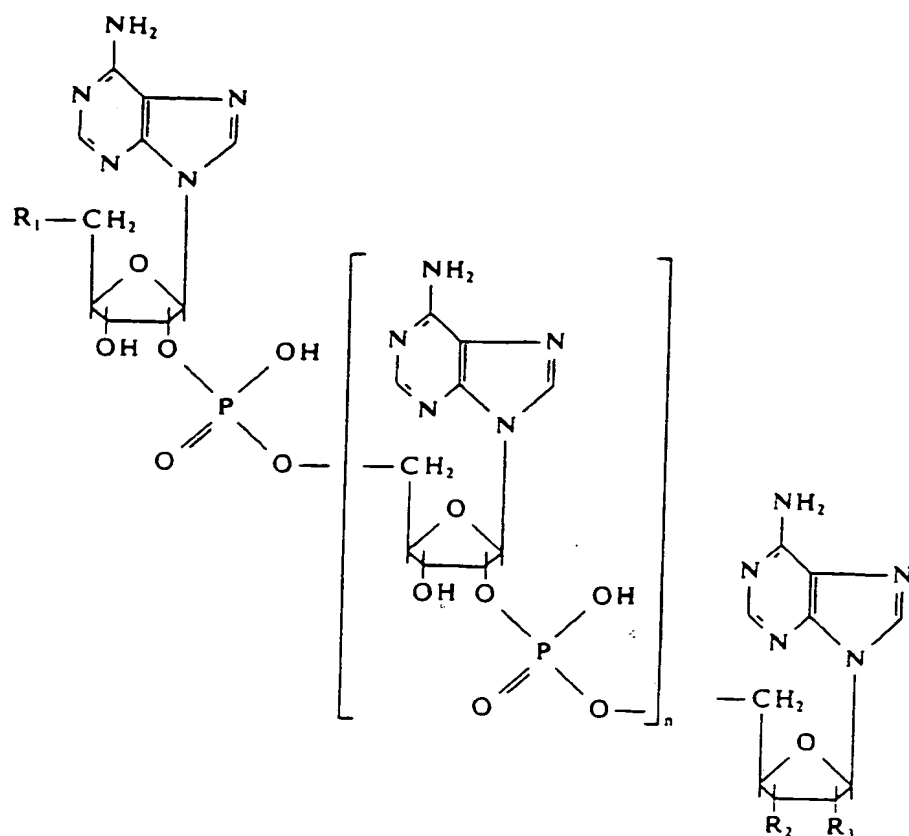
Patentanspruch

Verwendung von 2',5'-Oligoadenylaten der Formel

55

60

65



als Einzelverbindungen oder als ihre Gemische, worin R_1 immer OH bedeutet, bei B R_2 OH und R_3 PO_4^{-2} oder R_2 PO_4^{-2} und R_3 OH bedeuten, bei C $R_2 = R_3 = OH$; n größer oder gleich 1 ist und insbesondere 1 bis 5, vorzugsweise 1 oder 2 bedeutet, jede Verbindung vom Typ B ein Gemisch von zwei Isomeren darstellt, worin $R_2 = OH$ und $R_3 = H_2PO_4$ oder $R_2 = H_2PO_4$ und $R_3 = OH$, wobei insbesondere das Gemisch B Adenosin-2'(3')-monophosphat und Einzeloligomere vom Typ B mit n gleich 1, 2, 3 oder mehr in einem molaren Verhältnis von zum Beispiel 50—70:20—50:8—15:2—7:~2 enthält, bei Verbindungen vom Typ C $R_2 = R_3$ und OH bedeutet, und das Gemisch C Adenosin und Einzeloligomere mit n gleich 1, 2, 3 oder mehr in einem molaren Verhältnis von z. B. 50—70:20—50:8—15:2—7:~2 enthält, zur Behandlung von viralen, durch Papillomaviren verursachten Erkrankungen der Haut und von Schleimhautgeweben durch örtliche Anwendung.

- Leerseite -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)